

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AA

(11)Publication number : 2002-262883

(43)Date of publication of application : 17.09.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 1/113
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/08
// C12N 9/90
(C12P 21/08
C12R 1:01)

(21)Application number : 2001-070928

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD
MARINE BIOTECHNOL INST CO
LTD

(22)Date of filing : 13.03.2001

(72)Inventor : IDENO AKIRA
MARUYAMA TADASHI
FURUYA MASAHIRO

(54) METHOD FOR PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a low cost, efficient and in vitro method for producing a monoclonal antibody having a high specificity and high affinity.

SOLUTION: This method for producing the monoclonal antibody is provided by (a) co-expressing an antibody gene with a gene encoding a PPIase having a chaperone-like activity in a transformed body, and producing the monoclonal antibody as a soluble fraction, or (b) solubilizing the monoclonal antibody expressed as an inclusion body with a modifying agent, and further folding it in the presence of the PPIase having the chaperone-like activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-262883

(P2002-262883A)

(43) 公開日 平成14年9月17日 (2002.9.17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 1/113	4 B 0 2 4
C 0 7 K 1/113		C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 4
1/19		1/21	4 B 0 6 5
1/21		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-70928 (P2001-70928)

(22) 出願日 平成13年3月13日 (2001.3.13)

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

東京都文京区本郷1丁目28番10号

(72) 発明者 井手野 晃

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会

社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内

(74) 代理人 100106596

弁理士 河備 健二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 安価で、効率的な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法の提供。

【解決手段】 (a) 抗体遺伝子とシャペロン様活性を有する P P I a s e をコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させること、又は、(b) 封入体として発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャペロン様活性を有する P P I a s e の共存下でフォールディングさせることにより提供。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体遺伝子とシャペロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを含む形質転換体。

【請求項2】 請求項1に記載の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャペロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項3】 シャペロン様活性を有するPPaseをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPPase遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 古細菌由来FKBPタイプPPase遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】 抗体遺伝子が、Fab遺伝子であることを特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項6】 Fab遺伝子が、マウスIgG由来Fab遺伝子であることを特徴とする請求項5に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】 インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャペロン様活性を有するPPaseの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項8】 シャペロン様活性を有するPPaseが、古細菌由来FKBPタイプPPase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPase、及び真核生物由来FKBP52タイプPPaseからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項7に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項9】 古細菌由来FKBPタイプPPaseが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPaseであることを特徴とする請求項8に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項10】 モノクローナル抗体が、Fabであることを特徴とする請求項7~9のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項11】 Fabが、マウスIgG由来のFabであることを特徴とする請求項10に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、イン・ビトロでのモノクローナル抗体の製造方法に関し、さらに詳しく

は、シャペロン様活性を有するPPaseの機能を利用した、安価で、高効率な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 抗体は、分子量が10万Daを越える巨大分子であり、特定の抗原物質に特異的に結合する機能が利用され、分析用試薬、生体外診断薬等として幅広く使用されている。抗体分子において、抗原物質との結合に寄与している部分は、V領域（可変領域）と呼ばれ、H鎖のV領域とL鎖のV領域とから構成されている。特定抗原に対する抗体を取得する方法としては、ラットやウサギ等の実験動物に抗原物質を免疫感作させ、その血清に含まれる抗体（ポリクローナル抗体）を得る方法と、次に述べるモノクローナル抗体を得る方法が一般的である。

【0003】 モノクローナル抗体は、単一クローンの抗体産生細胞が産生する抗体であり、その特徴は一次構造が均一なことである。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインによるハイブリドーマ技術の確立によって容易に製造できるようになった。この方法では、まず、所定の抗原物質をマウス等の実験動物に投与して免疫感作を行う。次に、免疫感作された動物の脾臓から、該抗原物質に対する抗体産生能を獲得した脾臓細胞を取り出し、これをミエローマのような適切な腫瘍細胞と融合させてハイブリドーマを作製する。次いで、ELISA等の適当な免疫分析法を用いたスクリーニングにより、目的の抗体物質を産生しているハイブリドーマを選択する。その後、限界希釈法等を用いてクローニングすることにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立する。こうして樹立されたハイブリドーマを適当な培地中で培養した後、その代謝産物を含む培地をクロマトグラフ等を用いて分離することにより、目的のモノクローナル抗体が得られる。

【0004】 現在、ハイブリドーマ技術はモノクローナル抗体を取得するための方法として汎用されているが、この方法は、動物に対する免疫感作というイン・ビボでの生体反応を利用しているため、必然的に実験動物の介在を必要とする。即ち、モノクローナル抗体を取得するためには、実験動物を飼育維持しなければならず、煩雑な労力を必要とするとともに、多大なコストが必要となる。また、この方法では、生体反応を利用しているために試行錯誤的な要素が含まれ、必ずしも全ての抗原物質に対するモノクローナル抗体が製造できるとは限らないという問題がある。

【0005】 一方、近年、遺伝子工学技術が飛躍的に進歩し、大腸菌の表層に、抗体のH鎖及びL鎖のV領域のみを適当なリンカーを介して連結させたscFV（single chain Fv）、抗体のFab部分等を発現することが可能となった。また、PCR法を用いて抗体遺伝子をランダムに増幅することで抗体遺伝子のラ

イブラリーを作製、細胞外に提示させ、これらのライブラリーから特定抗原に親和性を有するものをスクリーニングする方法が開発されつつある（熊谷ら、タンパク質・核酸・酵素、1998、43、159-167）。従って、このスクリーニング法によって得られた抗体遺伝子を、大腸菌等を用いて遺伝子工学的に発現できれば、実験動物を用いることなく目的の抗原に対する抗体を生産することが可能となる。

【0006】しかしながら、上記技術には、例えば、大腸菌を用いて抗体遺伝子を大量発現させる場合、抗体のほとんどが不溶性のインクルージョンボディ（封入体）として発現され、活性型を直接的に得ることはできないという問題がある。

【0007】このため、抗体遺伝子にシグナル配列を連結し、ペリプラズム領域に抗体を分泌発現させる方法も提案されているが、分泌量が極めて少ない（Pluckthun, Biotechnology, 1991, 9, 545）ため、実用的な方法とはいえない。ところで、FabはscFVと比べて構造が安定であるため機能性に優れているという利点を有するが、技術的な困難性が高いためか、scFVタイプの抗体の大腸菌細胞内での発現に関する報告（Wirts et al., (2000) Protein Sci. 8, 2245）はあるものの、Fabタイプの抗体の発現に関する報告は未だない。

【0008】また、活性型の抗体を効率的に生産するために、タンパク質の立体構造形成や構造変化に関与する因子を、抗体のリフォールディングに利用することも検討されており、例えば、特開平9-220092号公報には、封入体として発現された抗体を、塩酸グアニジン等で可溶化し、シャペロニンを用いてリフォールディングさせる方法や、抗体遺伝子をシャペロニン遺伝子と大腸菌内で共発現させる方法が開示されている。しかしながら、シャペロニンをタンパク質生産に応用する場合には、ATP、CTP、UDPといった高エネルギー物質を共存させる必要があり、また、シャペロニンは、目的タンパク質と1:1のモル比率で作用するため、分子量が100万Daに近い高分子量のシャペロニンを目的タンパク質に対して非常に高濃度で用いる必要もあり、利便性に欠け、経済性にも欠けるという問題がある。

【0009】なお、シャペロニンは、熱ショックタンパク質の一群であり、細胞が温度変化等の様々な環境ストレスにさらされた際に産生されるが、これらは、原核生物、真核生物を問わず広く存在しており、特に、大腸菌から産生される分子シャペロンとしてのGroEが良く知られている。また、このGroEは、タンパク質の種類を選ばず、非特異的にタンパク質の立体構造形成に関与することも明らかにされている。例えば、上記GroEの構成体であるGroELは、7個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計

14サブユニットからなる特徴的な構造を有しているが、このドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATP等のヌクレオチドの消費と、補助因子であるGroESの結合によって、変性タンパク質を正しい立体構造のタンパク質へと効率的に折り畳むことが知られている。

【0010】さらに、特開平11-285398号公報には、メタノコッカス属細菌から調製したPPIase（Peptidyl prolyl cis-trans isomerase）を変性タンパク質のリフォールディングに利用することが開示されているが、高い特異性、親和性を要求される抗体のリフォールディングへの適用は検討されておらず、また、変性タンパク質のリフォールディング効率の点からも十分満足できるものではなかった。なお、PPIaseは、後述のように、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合の回転を促し、タンパク質高次構造の再生速度を促進させる機能（PPIase活性）を有する酵素である。

【0011】上記のとおり、実験動物を用いることなく、目的の抗原に対する抗体を遺伝子工学的に生産するための方法が種々検討されているが、発現-フォールディング効率の点からは十分満足できるものではなく、高い特異性、親和性を有するモノクローナル抗体を遺伝子工学的に生産する方法のさらなる効率向上が望まれている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記の従来技術の問題点に鑑み、安価で、高効率な、イン・ビトロでの高特異性、高親和性モノクローナル抗体の製造方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究した結果、(a)抗体遺伝子とシャペロン様活性を有するPPIaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させること、又は、(b)インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャペロン様活性を有するPPIaseの共存下でフォールディングさせることにより、上記課題が達成されることを見出し、斯かる知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0014】即ち、本発明の第1の発明によれば、抗体遺伝子とシャペロン様活性を有するPPIaseをコードする遺伝子とを含む形質転換体が提供される。

【0015】また、本発明の第2の発明によれば、第1の発明の形質転換体を培養して、抗体遺伝子とシャペロン様活性を有するPPIaseをコードする遺伝子とを形質転換体内で共発現させ、モノクローナル抗体を可溶画分として産生させることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0016】また、本発明の第3の発明によれば、第1又は第2の発明において、シャペロン様活性を有するPPIaseをコードする遺伝子が、古細菌由来FKBPタイプPPIase遺伝子、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPIase遺伝子、及び真核生物由来FKBP52タイプPPIase遺伝子からなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0017】また、本発明の第4の発明によれば、第3の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPIase 10 遺伝子が、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPIaseをコードする遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0018】また、本発明の第5の発明によれば、第1~第4のいずれかの発明において、抗体遺伝子が、Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0019】さらに、本発明の第6の発明によれば、第5の発明において、Fab遺伝子が、マウスIgG由来Fab遺伝子であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0020】一方、本発明の第7の発明によれば、インクルージョンボディとして発現させたモノクローナル抗体を、変性剤によって可溶化させ、さらにシャペロン様活性を有するPPIaseの共存下でフォールディングさせることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0021】また、本発明の第8の発明によれば、第7の発明において、シャペロン様活性を有するPPIaseが、古細菌由来FKBPタイプPPIase、バクテ 30 リア由来トリガーファクタータイプPPIase、及び真核生物由来FKBP52タイプPPIaseからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0022】また、本発明の第9の発明によれば、第8の発明において、古細菌由来FKBPタイプPPIaseが、16~18kDaの古細菌由来FKBPタイプPPIaseであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0023】また、本発明の第10の発明によれば、第 40 7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、Fabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0024】さらに、本発明の第11の発明によれば、第7~第9のいずれかの発明において、モノクローナル抗体が、マウスIgG由来のFabであることを特徴とするモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0025】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0026】1. PPIase (Peptidyl p 50

rolyl cis-trans isomeras
e)

本発明で用いられるPPIase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase) は、シャペロン様活性を有する、古細菌由来のFKBPタイプPPIase、バクテリア由来トリガーファクタータイプPPIase、及び真核生物由来52kDa FKBPタイプPPIaseからなる群から選ばれた少なくとも1種のPPIaseである。

【0027】PPIaseは、免疫抑制剤として知られるサイクロスポリンやFK506のターゲット分子であり、これらの免疫抑制剤に対する感受性から、シクロフィリンタイプとFKBP (FK506 binding protein) タイプとに大別される。

【0028】また、PPIaseは、ポリペプチド鎖中のプロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストランス異性化反応を触媒することにより、タンパク質高次構造の再生速度を高める機能 (PPIase活性) を有することから、前記シャペロニンと同様に、タンパク質の安定化や変性タンパク質の再生に利用できるものとして期待されていた。

【0029】興味深いことに、古細菌由来のFKBPタイプPPIaseは、上記PPIase活性だけでなく、本来シャペロニンの機能とされていた、タンパク質巻き戻りの収量そのものを増大させる活性やタンパク質の不可逆的凝集を抑制する活性 (シャペロン様活性) を有し (Maruyama et al., 2000, Front Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836)、また、このシャペロン様活性は、バクテリア由来のトリガーファクター型PPIase (Huang, G.-C., et al. (2000) Protein Sci. 9, 1254-1261)、真核生物由来FKBP52タイプPPIase (Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717) にも見られる機能である。

【0030】また、PPIaseは、シャペロニンとは異なり、タンパク質生産への応用において、ATP等といった高エネルギー物質を必要とせず、分子量が小さいため、安価で、かつ取り扱い上の利便性も高く、さらに、発現-フォールディングの効率も高いという特徴を有する。

【0031】ここで、上記のシャペロン様活性は、ロダネーゼやクエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし (河田1998, バイオサイエンスとインダストリー56, 593-598)、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、PPIaseやシャペロニンを含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率で評価することができる。変性タンパク質の再生率を評

価する方法としては、例えば、ホロピッチらの方法が (Horowitz, 1995, Methods Mol. Biol. 40, 361-368)、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては、田口らの方法 (Taguchi et al. 1994, J. Biol. Chem. 269, 8529-8534) 等がそれぞれ挙げられる。

【0032】なお、上記の免疫抑制剤に非感受性でアミノ酸配列のホモロジーも異なるパーブリン (Parvulin) タイプが近年見つかっており、また、バク

テリア由来のトリガーファクターはFKBPと相同性の高い領域を持つため、FKBPタイプPPIaseのサブクラスと位置づけられている。

【0033】本発明で用いられる古細菌由来のFKBPタイプPPIaseとしては、例えば、アシディアヌス (Acidianus) 属、メタロスファエラ (Metallosphaera) 属、スティジオロバス (Stygiolobus) 属、スルフォロバス (Sulfolobus) 属、スルフロコッカス (Sulfurococcus) 属及びスルフィスファエラ (Sulfurisphaera) 属等のスルフォロバレス (Sulfolobales) 目、アエロバイラム (Aeropyrum) 属、デスルフロコッカス (Desulfurococcus) 属、ステッテリア (Stetteria) 属、スタフィロサーマス (Staphylothermus) 属、サーモディスカス (Thermodiscus) 属、イグネオコッカス (Igneococcus) 属、サーモスファエラ (Thermosphaera) 属、スルフォフォボコッカス (Sulfophobococcus) 属、ハイパーサーマス (Hyperthermus) 属、バイロディクティウム (Pyrodictium) 属、及びバイロロバス (Pyrolobus) 属等のイグネオコッカレス (Igneococcales) 目、バイロバキュラム (Pyrobaculum) 属、サーモプロテウス (Thermoproteus) 属、サーモフィラム (Thermophilum) 属、及びカルドコッカス (Caldococcus) 属等のサーモプロテアレス (Thermoproteales) 目、アーキオグロブス (Archaeoglobus) 属、及びフェログロブス (Ferroglobus) 属等のアーキオグロバレス (Archaeoglobales) 目、メタノサーマス (Methanothermus) 属、メタノバクテリア (Methanobacterium) 属、メタノサーモバクテリウム (Methanothermobacter) 属、及びメタノスファエラ (Methanosphaera) 属等のメタノバクテリアレス (Methanobacteriales) 目、メタノコッカス (Methanococcus) 属、メタノサーモコッカス (Methanothermococcus) 属、メタノカルドコッカス (M

ethanocaldococcus) 属、及びメタノイグニス (Methanoignis) 属等のメタノコッカレス (Methanococcales) 目、メタノミクロバイアレス (Methanomicrobiales) 目、メタノザルチナ (Methanosarcina) 属等のメタノザルチナレス (Methanosarcinales) 目、メタノバイラレス (Methanopyrales) 目、バイロコッカス (Pyrococcus) 属、及びサーモコッカス (Thermococcus) 属等のサーモコッカレス (Thermococcales) 目、サーモプラズマ (Thermoplasma) 属、及びピクロフィラス (Picrophilus) 属等のサーモプラズマレス (Thermoplasmatales) 目、ハロバクテリア (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、ナトゥノバクテリア (Natronobacterium) 属、ナトゥノコッカス (Natronococcus) 属、ハロアーキュラ (Halorcula) 属、ハロフェラックス (Halofera x) 属、ハロバキュラム (Halobaculum) 属、ハロルブラム (Halorubrum) 属、ナトゥリアルバ (Natrialba) 属、ナトゥロノモナス (Natronomonas) 属、ハロジェオメトリカム (Halogeometricum) 属、及びハロテリジェナ (Haloterrigena) 属等のハロバクテリアレス (Halobacteriales) 目等由来のPPIaseが挙げられる。

【0034】本発明においては、これら古細菌由来のPPIaseの中でも、好熱性又は超好熱性古細菌由来のPPIaseを使用することが好ましく、とりわけメタノコッカス属、サーモコッカス属、バイロコッカス属、サーモプラズマ属、メタノバクテリア属由来のPPIaseを使用することが好ましい。

【0035】また、古細菌由来のFKBPタイプのPPIaseは、分子量が17-18kDa程度の短いタイプのものと、分子量が26-33kDa程度の長いタイプのものとに分類される (Maruyama, T and Furutani, M Front Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836; Iida et al., 2000, Gene 256, 319-326)。本発明においては、いずれの分子量のPPIaseを用いてもよいが、発現-リフォールディング効率の観点から、17-18kDa程度の短いものを用いることが好ましい。古細菌由来PPIaseの一例として、メタノコッカス・ヤナシイ由来の18kDa FKBPタイプPPIaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号1、2にそれぞれ示す。

【0036】トリガーファクタータイプPPIaseは、ヒト由来12kDa FKBPタイプPPIaseと相同性の高い領域を有し、そのN末端とC末端に、そ

れぞれ約140アミノ酸と約200アミノ酸からなるドメインを形成するタンパク質である(Zarnit, et al. (1997) J. Mol. Biol. 271, 827-837)。これらは、タンパク質新生の初期段階においてリボソームと相互作用し、タンパク質のフォールディングに関与していると言われている。本発明で用いられるトリガーファクタータイプPPaseとしては、大腸菌やバチラス、サーモトガ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ等、バクテリア由来のものが挙げられる。バクテリア由来PPaseの一例として、大腸菌由来のトリガーファクタータイプPPaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号3、4にそれぞれ示す。

【0037】真核生物由来のFKBPタイプPPaseは、分子量が約52kDaであり、p59又はHSP56等と呼ばれる。そのアミノ酸配列は、ヒト由来12kDa FKBPタイプPPaseと相同性の高い領域2つがタンデムに連なり、さらに、そのC末端側にカルモジュリン結合部位を含む領域が連なった構造を有する(Ratajczak, T., et al. 1993, J. Biol. Chem. 268, 13187-13192)。また、これらは、PPase活性だけでなく、シャペロン様活性を持つことが報告されている(Bose, S., et al. (1996) Science 274, 1715-1717)。本発明においては、ヒト由来のものと相同性が高く、シャペロン様活性を示すものであれば、いずれのFKBP52タイプPPaseを用いてもよい。真核生物由来FKBPタイプPPaseの一例として、ヒト由来のFKBP52タイプPPaseのアミノ酸配列と遺伝子配列を、配列番号5、6にそれぞれ示す。

【0038】本発明においては、上記PPaseのいずれを用いてもよく、また2種以上を併用してもよいが、発現-リフォールディング効率の観点からは、古細菌由来の約16-18kDaのFKBPタイプPPaseを用いることが好ましい。さらに、本発明においては、タンパク質のフォールディング効率を向上させるために、ジスルフィド結合の組替えを促進する機能を有するPDI(プロテインジスルフィドイソメラーゼ)を併用してもよい。

【0039】2. 抗体遺伝子とPPase遺伝子との共発現

本発明においては、好ましい実施態様の一つとして、シャペロン様活性を有するPPase遺伝子とともに抗体遺伝子を形質転換体内で共発現させ、抗体遺伝子の発現産物を可溶画分に産生させる。

【0040】PPase遺伝子とともに抗体遺伝子を共発現させる方法としては、PPaseをコードする遺伝子を、例えば、pACYC系プラスミドの発現プロモーターの下流部に挿入し、宿主菌内に導入すればよ

い。抗体遺伝子がpET等のcolE1系のDNA複製開始領域を持つ発現ベクターに挿入されている場合、pACYCベクターは同ベクターと宿主菌内で共存可能であるため、それぞれのプラスミドに別の薬剤耐性マーカーを所有させておけば、両遺伝子が導入された形質転換体を選別でき、また、両遺伝子はそれぞれのプロモーター制御下で発現が可能となる。逆に、目的タンパク質をpACYC系に、PPase遺伝子をColE1系に組み込んでよい。もちろん、PPase遺伝子と抗体遺伝子を、一つの発現ベクター上に直列に挿入し、1つ又は2種以上のプロモーターで発現を制御してもよい。両遺伝子を含む形質転換体を適当な培地で培養し、両遺伝子の発現を誘導すれば、PPaseのPPase活性及びシャペロン様活性等の効果により、抗体のミスフォールディングが抑制されるとともに、抗体の封入体形成が妨げられ、可溶性画分に抗体が高効率に産生される。

【0041】3. 封入体のリフォールディング

本発明においては、好ましい他の実施態様の一つとして、大腸菌等の形質転換体によって封入体として発現させたモノクローナル抗体を変性剤によって可溶化し、シャペロン様活性を有するPPaseの共存下でリフォールディングさせる。

【0042】封入体は、不溶性のため、菌体を超音波破碎し、その不溶性画分を精製することで得られ、尿素又は塩酸グアニジン等を用いて可溶化することができる。可溶化した抗体をリフォールディングするには、可溶化した目的の抗体を上記のPPaseと共存させればよい。具体的には、封入体として発現した抗体を、あらかじめ8M尿素や6M塩酸グアニジンで可溶化しておき、PPaseを含む緩衝液で30-200倍に希釈すればよい。必要に応じて、緩衝液にはDTT等の様な還元剤やEDTA等のようなキレート剤等を加えておいてもよい。抗体とPPaseの混合比率は、モル比で、抗体1に対して、通常0.01-100、好ましくは0.1-30である。

【0043】4. 抗体

本発明の製造方法が適用可能な抗体としては、いずれの動物種由来の抗体であっても、いずれのサブクラスの抗体であってもよく、また、抗体全長であっても、Fab、scFV等であってもよい。本発明の製造方法は、Fabの産生、特に、マウス由来IgGからのFabの産生に好適に用いることができる。

【0044】

【実施例】以下、本発明の製造方法をさらに詳細に説明するために、実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。

【0045】〔実施例1〕サーモコッカス sp. KS-1由来FKBPタイプPPaseのシャペロン様活性

*Thermoplasma acidophilum*由来クエン酸合成酵素（以後CSという；Sigma社）を6M塩酸グアニジン及び5mM DTTを含む25mMリン酸ナトリウム（pH7.0）中に溶解し、50℃で30分変性させた。この変性CS 1に対し、特開平11-318464号公報記載のサーモコッカス sp. KS-1由来FKBPタイプPPase（以後TcFK）1.5-30倍量を含む25mMリン酸ナトリウム（pH7.0）で40倍に希釈することによりフォールディングを開始させた。反応は50℃で50分間（図1-1）、及び、30℃にて90分間（図1-2）行った。反応中のCSの最終濃度は0.33μMとした。CSの活性は文献[Srere, P. A., et al., (1963) Acta Chem. Scand. 17, S129-S134; Furutani, M., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 28399-28407]に従って測定し、ネイティブ型CSの活性を100%として相対評価した。50℃の実験に関しては、TcFKの代わりにRNase T1を、30℃の実験ではBSA及びヒト12kDa FKBPタイプPPaseをそれぞれ比較例として用いた。図1-1に示すとおり、TcFKは変性したCSのフォールディング収量を上げるシャペロン様活性を示した。比較例として用いたRNase T1にはシャペロン様活性は見られなかった。また、図1-2に示すように、30℃においてもTcFKはCSのフォールディング収量を向上させたのに対し、BSA及びヒト12kDa FKBPタイプPPaseにはシャペロン様活性は見られなかった。

【0046】〔実施例2〕サーモコッカス sp. KS-1由来FKBPタイプPPase及びその発現ユニットのクローニング

特開平11-318464号公報記載のサーモコッカス sp. KS-1由来FKBPタイプPPase (Tc*

TcFK遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
TcFK-Fc2	5'-gggcatgcaattaatacgaactcactatagg-3'
TcFK-Rcl	5'-cctctagaagaactaagcttctgagtc-3'

【0048】

【表2】

PCRの反応組成

Reaction buffer(×10)	10μl
DNTP	8μl
Ex Taq	0.5μl
p3FB1-3(10ng/μl)	2μl
TcFK-Fc2 (20pmol/μl)	4μl
TcFK-Rcl (20pmol/μl)	4μl
滅菌水	71.5μl
合計	100μl

【0049】

【表3】

*FK)の発現用プラスミドpEFE1-3を鋳型とし、T7プロモーターを上流に含むTcFK遺伝子をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、TcFK-Fc2及びTcFK-Rclをそれぞれ用いた（表1）。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表2及び表3に示すとおりである。DNAポリメラーゼは、Takara社Ex. Taqを使用した。PCR法によって得られた増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。DNA断片を滅菌水に溶解し、各約10~100ngに対して10倍量のpT7 blue Tプラスミドベクター(Novagen)を加え、さらに16℃にて1時間処理することによりDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をコンピテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を100μg ml⁻¹アンピシリンナトリウム、100μM IPTG及び0.004% X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晚37℃にて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを鋳型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを鋳型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER)を用いたシーケンス反応（プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー）を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をサーモコッカス sp. KS-1のTcFK遺伝子の塩基配列、及びT7プロモータ領域のそれと比較した結果、その遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

【0047】

【表1】

PCRの反応条件

プレヒート	94℃×5min	1cycle
変性	94℃×0.5min	30cycle
アニーリング	58℃×1min	
増幅	72℃×1min	

【0050】〔実施例3〕サーモコッカス sp. KS-1由来FKBPタイプPPaseの発現系構築

PPase遺伝子及びT7プロモータ領域を含むpT7 blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、PPase遺伝子発現ユニットをコードするDNA断片の切り出しを行った。制限酵素はSph I及びBam H Iの組み合わせを用いた。切断した遺伝子断

片は2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、あらかじめ制限酵素処理したpACYC184プラスミドDNA(和光純薬)にライゲーションした。得られたライゲーション反応液を $100\mu\text{g ml}^{-1}$ クロラムフェニコールを含有するLB寒天培地に接種し、一晚 37°C にて培養し、得られたコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを鋳型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。PPIase遺伝子を含む陽性コロニーからpACYC184プラスミドDNAを回収した。

【0051】〔実施例4〕マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子のクローニング

Ibaらによって構築されたAnti-HEL-Fab発現用プラスミドpAALFabを鋳型とし(Iba, Y., et al. 1997, Gene 194, 35-46)、H鎖及びL鎖をPCR法によって増幅した。遺伝子増幅用のプライマーとして、H鎖についてはHELVH-F1及びHELVH-R1を、L鎖についてはHELVL-F1及びHELVL-R1をそれぞれ用いた(表4)。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表5及び表6に示しておりである。DNAポリメラーゼは、Takara社Ex. Taqを使用した。PCR法によって得られた各々の増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及*

Anti-HEL-Fab遺伝子の増幅に用いたプライマー

名称	配列
HELVH-F1	5'-cccatatgcagggtgcagctgcaagagtca-3'
HELVH-R1	5'-ggaagcttgactgtctccttgaaatagaatttgca-3'
HELVL-F1	5'-ccaagcttatggacatcgagctcaccca-3'
HELVL-R1	5'-ggggatccttaagtcgactcacactcatt-3'

【0053】

【表5】

PCRの反応組成

Reaction buffer($\times 10$)	10 μl
DNTP	8 μl
Ex Taq	0.5 μl
pAALFab(10ng/ μl)	2 μl
HELVH-F1又はHELVL-F1(20pmol/ μl)	4 μl
HELVH-R1又はHELVL-R1(20pmol/ μl)	4 μl
滅菌水	71.5 μl
合計	100 μl

【0054】

【表6】

PCRの反応条件

プレヒート	94 $^\circ\text{C} \times 5\text{min}$	1cycle
変性	94 $^\circ\text{C} \times 0.5\text{min}$	30cycle
アニーリング	60 $^\circ\text{C} \times 1\text{min}$	
増幅	72 $^\circ\text{C} \times 1\text{min}$	

【0055】〔実施例5〕マウス由来抗-卵白リゾチム(HEL)Fab遺伝子の発現系構築

Anti-HEL-Fab H鎖、及び、L鎖をコード

*びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。H鎖及びL鎖それぞれのDNA断片を滅菌水に溶解し、各約10~100ngに対して10倍量のpT7 blueプラスミドベクター(Novagen)を加え、さらに 16°C にて1時間処理することによりそれぞれのDNA断片をライゲーションした。上記ライゲーション液をそれぞれのコンピテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を $100\mu\text{g ml}^{-1}$ アンピシリンナトリウム、 $100\mu\text{M}$ IPTG及び0.004% X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晚 37°C にて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のプラスミドDNAを鋳型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。それぞれの陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを鋳型とし、BIG Dye(PERKIN-ELMER)を用いたシーケンス反応(プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー)を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をAnti-HEL-Fab H鎖、及びL鎖の遺伝子の塩基配列と比較した結果、それらの遺伝子の配列と相違ないことを確認した。

【0052】

【表4】

する遺伝子を含むそれぞれのpT7 blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、Anti-HEL-Fab遺伝子断片の切り出しを行った。制限酵素はH鎖についてはNde I及びHind IIIの組み合わせを、L鎖についてはHind III及びBam HIをそれぞれ用いた。切断した遺伝子断片はそれぞれ2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、H鎖及びL鎖の順であらかじめ制限酵素(Nde I及びBam HI)処理したpET21aプラスミドDNA(Novagen)にライゲーションした。得られたライゲーション反応液をコンピテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした後、H鎖及びL鎖双方のAnti-HEL-Fab遺伝子を含む陽性コロニーからpET21aプラスミドDNAを回収した。

【0056】〔実施例6〕PPIase遺伝子とFab遺伝子の共発現

実施例3及び実施例5で得られたTcFK遺伝子を含むpACYC184プラスミド、及びAnti-HEL-

Fab遺伝子を含むpET21aプラスミドの共発現を試みた。両プラスミドをコンピテントセル大腸菌BL21 (DE3) 株に加えることによりトランスフォーメーションした後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン及びクロラムフェニコールを含む寒天培地にて培養した。得られたコロニーを2 \times YT培地 (Yeast Extract 16 g/L , BACTOTRYPTON 20 g/L , NaCl 5 g/L , アンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, クロラムフェニコール 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH7.5) 700 ml に接種した。35 $^{\circ}\text{C}$ で10回転培養 (110 rpm) した後、OD600が0.7となった時点で100 mM IPTGを添加することにより、TcFK及びAnti-HEL-Fabの発現を誘導した。遠心分離 (10000 $\text{rpm} \times 10 \text{ min}$) にて菌体を回収した。得られた菌体は1 mM EDTAを含む25 mM HEPES緩衝液 (pH6.8) 20 ml に懸濁し、-20 $^{\circ}\text{C}$ にて一晩凍結保存した。菌体を超音波破砕後、上清及び沈澱画分に分離し、それぞれをSDS-PAGEに供した (図2)。なお、図2-1中のレーン1はTcFK及びAnti-HEL-Fabを共発現させた大腸菌液、レーン2及び3は、それぞれ、その破砕液上清及び沈澱画分である。また、レーン4は、実施例4にて、大腸菌にTcFK遺伝子を組み込まず、クロラムフェニコールを除いた2 \times YT培地で培養した大腸菌の菌液である (比較例)。また、レーン5及び6は、それぞれ、その破砕液上清及び沈澱画分である。TcFKを発現させなかった場合、Anti-HEL-Fab遺伝子是不溶性画分に発現した (レーン6)。また、図2-2に示すように、発現したAnti-HEL-Fabを、anti-mouse IgG抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。上記のように、従来封入体としてしか発現しなかった抗体遺伝子を、TcFK遺伝子との共発現により、可溶画分に産生することが可能となった。

【0057】〔実施例7〕Fabの活性測定

得られたFabの活性は、HELを抗原とするELISA法において、1次抗体として機能するか否かで評価した。すなわち、96穴プレートに0.1 mg/ml ニトリ卵白リゾチーム (HEL) 溶液100 μl を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ にて3時間インキュベーションすることにより、HELを固定化した。PBS緩衝液 (pH7.0) にてプレートを洗浄後、ブロックエース (大日本製薬) を含むPSB緩衝液でブロッキングした (4 $^{\circ}\text{C}$ 、オーバーナイト)。PBSにて洗浄後、実施例6のTcFKとの共発現の結果得られた可溶性Anti-HEL-Fab *

* bを含む大腸菌上清液及び10%ブロックエースを含むPBSを1次抗体液として用い、室温にて3時間インキュベートした。PBSにて洗浄後、2次抗体として0.1% Anti-マウスIgG-HRPコンジュゲート (フナコシ) を含むPBS緩衝液でインキュベート (2時間、30 $^{\circ}\text{C}$) した。PBSにて洗浄後、HRPの基質としてABTS液 (フナコシ) 100 μl を加え、30分間インキュベートし、OD405を測定した。得られた結果を図3に示す。TcFKと共発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破砕液を1次抗体液として用いた場合、抗原に特異的に結合することが明らかである (■)。TcFKと共発現させたAnti-HEL-Fabを含む大腸菌破砕液の代わりに、共発現させなかった大腸菌破砕液を用いた場合と比べ (□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。

【0058】〔実施例8〕封入体のフォールディングと活性評価

実施例6で得られたAnti-HEL-Fabの封入体を精製し、6 M グアニジン塩酸を含むPBS緩衝液 (pH7.0) で1時間室温にてインキュベーションすることにより、封入体を可溶化させた。この変性Anti-HEL-Fab1に対し、20倍量のTcFKを含む25 mM リン酸ナトリウム (pH7.0) で40倍に希釈することにより、Anti-HEL-Fabのフォールディングを開始させた。反応は30 $^{\circ}\text{C}$ で90分間行った。得られた反応溶液を実施例7に記載した方法により、フォールディングしたAnti-HEL-Fabが一次抗体として機能するか否かを検討した。実施例7で用いた大腸菌破砕液の代わりに、上記反応溶液を用いてELISAにて評価した。結果を図4に示す。TcFKと反応させたAnti-HEL-Fabは (■)、作用させなかったものと比べ (□)、有意に一次抗体として機能していることが明らかである。これらは抗原がない場合、全く反応せず、高い特異性を示した。

【0059】

【発明の効果】以上のとおり、本発明によれば、実験動物を用いることなく、高効率に高特異性、高親和性のモノクローナル抗体を調製することができる。また、本発明によれば、抗体遺伝子と他のタンパク質やペプチド等をコードする遺伝子とを結合させることにより、多機能な抗体を調製することも可能となる。得られた抗体は、基礎研究分野だけでなく、診断分野、医療分野等の応用面においても極めて有用である。

【0060】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sekisui Chemical Co., Ltd
 <110> Marine Biotechnology Institute
 <130> 01P00164
 <160> 6

17
 <210> 1
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Methanococcus jannaschii
 <400> 1
 Met Ile Asn Leu Ile Lys Lys Gly Asp Tyr Val Lys Val Asp Tyr Ile
 1 5 10 15
 Leu Glu Val Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Ser Ile Glu Glu Val Ala
 20 25 30
 Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Tyr Pro Glu Arg Glu Tyr Glu Pro Ile Gly
 35 40 45
 Phe Ile Val Gly Asn Gly Glu Leu Ile Glu Gly Phe Glu Glu Ala Val
 50 55 60
 Ile Gly Met Glu Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Thr Ile Pro Pro Glu
 65 70 75 80
 Lys Gly Tyr Gly Leu Arg Asp Glu Arg Leu Ile Gln Glu Ile Pro Lys
 85 90 95
 Glu Met Phe Ala Asp Ala Asp Phe Glu Pro Gln Glu Gly Met Leu Ile
 100 105 110
 Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Lys Ile Ile Lys Val Thr Asp Asp Thr
 115 120 125
 Val Thr Leu Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Leu Lys Phe
 130 135 140
 Thr Ile Lys Val Arg Asp Val Gln Pro Ala Glu Ser Glu
 145 150 155

<210> 2
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Methanococcus jannaschii
 <400> 2
 atg att aac ttg att aaa aaa ggt gac tat gtc aaa gta gat tat ata 48
 tta gaa gta gat gga aaa gtt att gac aca tca att gaa gaa gta gct 96
 aaa gaa aat aaa ata tac tat cct gaa aga gaa tat gag cca att gga 144
 ttt att gta ggt aat gga gaa tta atc gaa ggt ttt gaa gag gct qtt 192
 ata ggc atg gaa gtt gga gaa gaa aaa act gta aca att cct cct gaa 240
 aaa ggt tat gga ctt aga gat gag aga tta atc caa gaa ata cct aag 288
 gaa atg ttt gct gat gct gac ttt gaa cca caq gag gga atg tta atc 336
 tta gcc agt gga att cct gca aag ata ata aaa gtt act gat gat act 384
 gta act tta gac ttt aac cac gag ctt gct gga aaa gaa tta aaa ttc 432
 aca ata aaa gta aga gat gtc caq cca gct gag tca gaa taa 471

<210> 3
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 3
 Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
 1 5 10 15
 Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu

19 20 25 30
 Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45
 Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
 50 55 60
 Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr
 100 105 110
 Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
 115 120 125
 Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu
 130 135 140
 Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala
 145 150 155 160
 Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu
 165 170 175
 Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly
 180 185 190
 Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly
 195 200 205
 Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu
 210 215 220
 Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 245 250 255
 Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
 260 265 270
 Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser
 275 280 285
 Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala
 290 295 300
 Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
 305 310 315 320
 Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
 325 330 335
 Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
 340 345 350
 Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
 355 360 365
 Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
 370 375 380
 Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
 385 390 395 400
 Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
 405 410 415
 Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala

21

22

420

425

430

<210> 4

<211> 1296

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

```

atg caa gtt tca gtt gaa acc act caa ggc ctt ggc cgc cgt gta acg 48
att act atc gct gct gac agc atc gag acc gct gtt aaa agc gag ctg 96
gtc aac gtt gcg aaa aaa gta cgt att gac ggc ttc cgc aaa ggc aaa 144
gtg cca atg aat atc gtt gct cag cgt tat ggc gcg tct gta cgc cag 192
gac gtt ctg ggt gac ctg atg agc cgt aac ttc att gac gcc atc att 240
aaa gaa aaa atc aat ccg gct ggc gca ccg act tat gtt ccg ggc gaa 288
tac aag ctg ggt gaa gac ttc act tac tct gta gag ttt gaa gtt tat 336
ccg gaa gtt gaa ctg cag ggt ctg gaa gcg atc gaa gtt gaa aaa ccg 384
atc gtt gaa gtg acc gac gct gac gtt gac ggc atg ctg gat act ctg 432
cgt aaa cag cag gcg acc tgg aaa gaa aaa gac ggc gct gtt gaa gca 480
gaa gac cgc gta acc atc gac ttc acc ggt tct gta gac ggc gaa gag 528
ttc gaa ggc ggt aaa gcg tct gat ttc gta ctg gcg atg ggc cag ggt 576
cgt atg atc ccg ggc ttt gaa gac ggt atc aaa ggc cac aaa gct ggc 624
gaa gag ttc acc atc gac gtg acc ttc ccg gaa gaa tac cac gca gaa 672
aac ctg aaa ggt aaa gca gcg aaa ttc gct atc aac ctg aag aaa gtt 720
gaa gag cgt gaa ctg ccg gaa ctg act gca gaa ttc atc aaa cgt ttc 768
ggc gtt gaa gat ggt tcc gta gaa ggt ctg cgc gct gaa gtg cgt aaa 816
aac atg gag cgc gag ctg aag agc gcc atc cgt aac cgc gtt aag tct 864
cag gcg atc gaa ggt ctg gta aaa gct aac gac atc gac gta ccg gct 912
gcg ctg atc gac agc gaa atc gac gtt ctg cgt cgc cag gct gca cag 960
cgt ttc ggt ggc aac gaa aaa caa gct ctg gaa ctg ccg cgc gaa ctg 1008
ttc gaa gaa cag gct aaa cgc cgc gta gtt gtt ggc ctg ctg ctg ggc 1056
gaa gtt atc cgc acc aac gag ctg aaa gct gac gaa gag cgc gtg aaa 1104
ggc ctg atc gaa gag atg gct tct gcg tac gaa gat ccg aaa gaa gtt 1152
atc gag ttc tac agc aaa aac aaa gaa ctg atg gac aac atg cgc aat 1200
gtt gct ctg gaa gaa cag gct gtt gaa gct gta ctg gcg aaa gcg aaa 1248
gtg act gaa aaa gaa acc act ttc aac gag ctg atg aac cag cag gcg 1296
taa 1299

```

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Met Thr Ala Glu Glu Met Lys Ala Thr Glu Ser Gly Ala Gln Ser Ala
 1             5             10             15
Pro Leu Pro Met Glu Gly Val Asp Ile Ser Pro Lys Gln Asp Glu Gly
 20             25             30
Val Leu Lys Val Ile Lys Arg Glu Gly Thr Gly Thr Glu Met Pro Met
 35             40             45
Ile Gly Asp Arg Val Phe Val His Tyr Thr Gly Trp Leu Leu Asp Gly
 50             55             60
Thr Lys Phe Asp Ser Ser Leu Asp Arg Lys Asp Lys Phe Ser Phe Asp
 65             70             75             80

```

23	24
Leu Gly Lys Gly Glu Val Ile Lys Ala Trp Asp Ile Ala Ile Ala Thr	
85	90
Met Lys Val Gly Glu Val Cys His Ile Thr Cys Lys Pro Glu Tyr Ala	
100	105
Tyr Gly Ser Ala Gly Ser Pro Pro Lys Ile Pro Pro Asn Ala Thr Leu	
115	120
Val Phe Glu Val Glu Leu Phe Glu Phe Lys Gly Glu Asp Leu Thr Glu	
130	135
Glu Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu Gly	
145	150
Tyr Ala Lys Pro Asn Glu Gly Ala Ile Val Glu Val Ala Leu Glu Gly	
165	170
Tyr Tyr Lys Asp Lys Leu Phe Asp Gln Arg Glu Leu Arg Phe Glu Ile	
180	185
Gly Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Arg Ala Ile	
195	200
Gln Arg Met Glu Lys Gly Glu His Ser Ile Val Tyr Leu Lys Pro Ser	
210	215
Tyr Ala Phe Gly Ser Val Gly Lys Glu Lys Phe Gln Ile Pro Pro Asn	
225	230
Ala Glu Leu Lys Tyr Glu Leu His Leu Lys Ser Phe Glu Lys Ala Lys	
245	250
Glu Ser Trp Glu Met Asn Ser Glu Glu Lys Leu Glu Gln Ser Thr Ile	
260	265
Val Lys Glu Arg Gly Thr Val Tyr Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Lys Gln	
275	280
Ala Leu Leu Gln Tyr Lys Lys Ile Val Ser Trp Leu Glu Tyr Glu Ser	
290	295
Ser Phe Ser Asn Glu Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Leu Arg Leu Ala	
305	310
Ser His Leu Asn Leu Ala Met Cys His Leu Lys Leu Gln Ala Phe Ser	
325	330
Ala Ala Ile Glu Ser Cys Asn Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn Asn	
340	345
Glu Lys Gly Leu Phe Arg Arg Gly Glu Ala His Leu Ala Val Asn Asp	
355	360
Phe Glu Leu Ala Arg Ala Asp Phe Gln Lys Val Leu Gln Leu Tyr Pro	
370	375
Asn Asn Lys Ala Ala Lys Thr Gln Leu Ala Val Cys Gln Gln Arg Ile	
385	390
Arg Arg Gln Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Asn Met Phe Glu	
405	410
Arg Leu Ala Glu Glu Glu Asn Lys Ala Lys Ala Glu Ala Ser Ser Gly	
420	425
Asp His Pro Thr Asp Thr Glu Met Lys Glu Glu Gln Lys Ser Asn Thr	
435	440
Ala Gly Ser Gln Ser Gln Val Glu Thr Glu Ala	
450	455

25

26

<211> 1377

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

atg aca gcc gag gag atg aag gcg acc gag agc ggg gcg caq tcg gcc 48
ccg ctg ccc atg gag gga gtg gac atc agc ccc aaa caq gac gaa ggc 96
gtg ctg aag gtc atc aag aga gag ggc aca ggt aca gag atg ccc atg 144
att ggg gac cga gtc ttt gtc cac tac act ggc tgg cta tta gat ggc 192
aca aag ttt gac tcc agt ctg gat cgc aag gac aaa ttc tcc ttt gac 240
ctg gga aaa ggg gag gtc atc aag gct tgg gac att gcc ata gcc acc 288
atg aag gtg ggg gag gtg tgc cac atc acc tgc aaa cca gaa tat gcc 336
tac ggt tca gca ggc agt cct cca aag att ccc ccc aat gcc acg ctt 384
gta ttt gag gtg gag ttg ttt gag ttt aag gga gaa gat ctg acg gaa 432
gag gaa gat ggc gga atc att cgc aga ata caq act cgc ggt gaa ggc 480
tat gct aag ccc aat gag ggt gct atc gtg gag gtt gca ctg gaa ggg 528
tac tac aag gac aag ctc ttt gac caq cgg gag ctc cgc ttt gag att 576
ggc gag ggg gag aac ctg gat ctg cct tat ggt ctg gag agg gcc att 624
cag cgc atg gag aaa gga gaa cat tcc atc gtg tac ctc aag ccc agc 672
tat gct ttt ggc agt gtt ggg aag gaa aag ttc caa atc cca cca aat 720
gct gag ctg aaa tat gaa tta cac ctc aag agt ttt gaa aag gcc aag 768
gag tct tgg gag atg aat tca gaa gag aag ctg gaa caq agc acc ata 816
gtg aaa gag cgg ggc act gtg tac ttc aag gaa ggt aaa tac aag caa 864
gct tta cta caq tat aag aag atc gtg tct tgg ctg gaa tat gag tct 912
agt ttt tcc aat gag gaa gca caq aaa gca caq gcc ctt cga ctg gcc 960
tct cac ctc aac ctg gcc atg tgt cat ctg aaa cta caq gcc ttc tct 1008
gct gcc att gaa agc tgt aac aag gcc cta gaa ctg gac agc aac aac 1056
gag aag ggc ctc ttc cgc cgg gga gag gcc cac ctg gcc gtg aat gac 1104
ttt gaa ctg gca cgg gct gat ttc caq aag gtc ctg caq ctc tac ccc 1152
aac aac aaa gcc gcc aag acc caq ctg gct gtg tgc caq caq cgg atc 1200
cga agg caq ctt gcc cgg gag aag aag ctc tat gcc aat atg ttt gag 1248
agg ctg gct gag gag gag aac aag gcc aag gca gag gct tcc tca gga 1296
gac cat ccc act gac aca gag atg aag gag gag caq aag agc aac acg 1344
gca ggg agc caq tct caq gtg gag aca gaa gca taq 1377

```

【図面の簡単な説明】

【図1】サーモコッカス *s.p.* KS-1由来FKBPタイプPPaseのシャペロン様活性を示す図である。

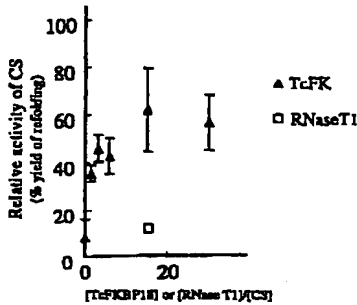
【図2】古細菌由来FKBP型PPaseとマウス由来Anti-HEL-Fabの共発現を示す図である。

【図3】共発現で得られたAnti-HEL-Fabの活性を示す図である。

【図4】封入体をリフォールディングして得られたAnti-HEL-Fabの活性を示す図である。

【図1】

図1-1 TcFKのシャペロン様活性(50℃)



【図2】

図2-1 クーマシーブリリアントブルーによる染色

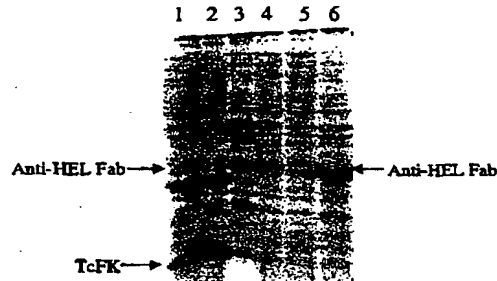


図1-2 TcFKのシャペロン様活性(30℃)

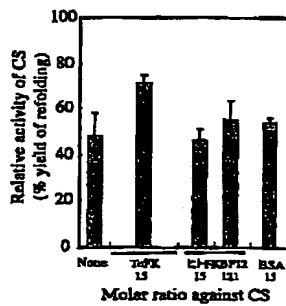
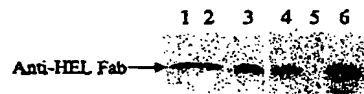
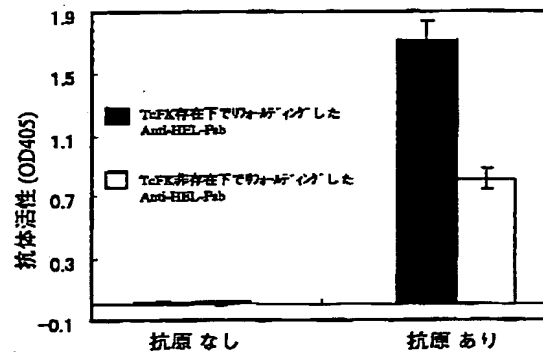


図2-2 抗マウスIgG抗体(ヤギ)による染色



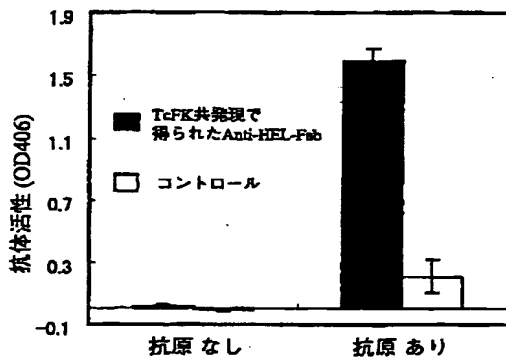
【図4】

図4 インクルージョンボディをリフォールディングして得られたAnti-HEL-Fabの活性



【図3】

図3 共発現の結果得られた組み換え型HEL-Fabの活性評価



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 12 N 5/10

C 12 N 9/90

C 12 P 21/08

(C 12 P 21/08

// C 12 N 9/90

C 12 R 1:01)

BEST AVAILABLE COPY

(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:01)

C 1 2 N 15/00
5/00

Z N A A
A

(72)発明者 丸山 正
岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社バイオテクノロジー研究所釜石研究所内
(72)発明者 古谷 昌弘
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学
工業株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA07 BA43
CA04 DA06 EA04 GA11 HA01
4B050 CC07 DD02 EE10 LL05
4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01Y AA26X AA91Y AB01
AC14 BA02 BC50 CA25 CA44
CA46
4H045 AA20 BA10 CA11 CA42 DA76
DA89 EA20 EA50 FA67 FA74